

平成 27 年 8 月 25 日

報道関係者各位

国立大学法人 筑波大学  
国立循環器病研究センター

## 腫瘍血管新生における低分子量 G 蛋白質 Arf6 の生理機能の解明 ～Arf6 シグナル伝達系を標的とした新たな抗癌剤の開発に繋がる可能性～

### 研究成果のポイント

1. 低分子量 G 蛋白質 Arf6 は、血管内皮細胞において腫瘍血管新生を制御することにより腫瘍の成長を制御することを明らかにしました。
2. 血管内皮細胞の Arf6 は、肝細胞増殖因子シグナルの下流で接着分子 $\beta 1$  integrin の細胞内小胞輸送を制御することにより腫瘍血管新生を制御していることを見出しました。
3. この研究成果は、Arf6 シグナル伝達系が血管新生阻害剤の新たな創薬標的となり得ることを示しており、新規抗癌剤の開発に繋がることと期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 本宮綱記助教、船越祐司助教、金保安則教授らの研究グループは、国立循環器病研究センター研究所の福原茂朋室長・望月直樹部長の細胞生物学グループほかとの共同研究により、遺伝子改変マウスを用いた解析を行い、血管内皮細胞に発現する低分子量G蛋白質<sup>注1)</sup> Arf6が腫瘍血管新生において重要な役割を果たしており、腫瘍の成長に深く関わっていることを明らかにしました。

腫瘍の成長には、血液からの酸素や栄養素の供給が不可欠です。そのため癌細胞は、様々な血管誘導因子を放出することで、周囲の既存血管から毛細血管を新生させて腫瘍に進入させる、「腫瘍血管新生」を誘導します。したがって、腫瘍血管新生を抑制することによって腫瘍の成長を阻害できるため、現在までに種々の腫瘍血管新生阻害剤が開発されてきました。しかし、現在臨床応用されている腫瘍血管新生阻害剤はその治療効果が限定的であり、より効果的な抗癌剤の開発が必要とされています。

本研究グループは、細胞内小胞輸送<sup>注2)</sup>や細胞運動を制御する低分子量G蛋白質のArf6に着目し、血管内皮細胞のArf6遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルの解析により、Arf6が腫瘍血管新生に重要な役割を果たすことを明らかにしました。また、Arf6は、癌細胞が分泌する肝細胞増殖因子(HGF)により誘導される腫瘍血管新生を制御していることを見出しました。さらに、HGFシグナルの下流ではGrp1と呼ばれる蛋白質がArf6の活性化に寄与しており、活性化したArf6は接着分子<sup>注3)</sup>である $\beta 1$  integrinの細胞膜への輸送を制御することで腫瘍血管新生に関与することを明らかにしました。この結果は、Arf6シグナル伝達系が血管新生阻害剤の新たな創薬標的として位置づけられることを意味しており、今後新たな抗癌剤が開発されることが期待されます。

本研究の成果は、2015年8月4日付けで、オンライン科学雑誌「Nature Communications」で公開されました。

\* 本研究は、JSPS科学研究費、佐川がん研究振興財団、安田記念医学財団、横山臨床薬理研究助成基金の助成によって実施されました。

## 研究の背景

腫瘍は、様々な血管誘導因子を放出して腫瘍血管新生を誘導することにより、血管から酸素や栄養素を摂取して成長します。そのため、腫瘍血管新生を阻害することで腫瘍の成長を阻止することができることから、血管新生阻害剤の開発が精力的に展開されてきました。特に、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は血管新生において極めて重要な分子であり、これまでにスニチニブやベバシツマブなどの VEGF シグナル阻害剤が多数開発され、抗癌剤として臨床応用されています。しかし、これらの薬剤の抗腫瘍効果は限定的であり、癌患者の予後を大きく改善するには至っていないのが現状です。その理由として、腫瘍細胞は VEGF 以外にも、肝細胞増殖因子(HGF)や塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)など様々な血管誘導因子を分泌するため、VEGF シグナル阻害剤だけでは腫瘍血管新生を効果的に抑制できない可能性が指摘されています(Grepin R. and Pages G., 2010)。そのため、これらの VEGF 以外の血管誘導因子に関しても、そのシグナル伝達機構の解明と臨床応用可能な阻害剤の開発が必要となりつつあります。

## 研究内容と成果

低分子量G蛋白質のArf6は、細胞内小胞輸送やアクチン細胞骨格の再構成<sup>注4)</sup>を制御する細胞内の蛋白質です。本研究グループはこれまでに *Arf6* 遺伝子を全身で欠損させたマウスを作製・解析した結果、Arf6 は HGF シグナルの下流で機能し、胎仔期において肝臓の発達に必須の分子であるという知見を得ています(Suzuki T. et al., 2006)。このことから、Arf6 は個体において HGF シグナルの下流で重要な機能を担っていることが予想されました。

そこで本研究では、Cre/loxP システムを利用したコンディショナルノックアウト法<sup>注5)</sup>により血管内皮細胞の *Arf6* 遺伝子を欠失したマウス(EC-*Arf6* cKO マウス)を作製し、マウス背中皮下に腫瘍細胞を移植して腫瘍血管新生および腫瘍組織の成長を検討しました。その結果、EC-*Arf6* cKO マウスでは、コントロールマウス(ノックアウト処理をしていないマウス)と比較して、腫瘍血管新生とそれに伴う腫瘍の成長が有意に抑制されていました。さらに、*Arf6* 遺伝子を欠損した血管内皮細胞では、HGF 刺激依存的に誘導される血管新生が特異的に抑制されることがわかりました。次に詳細な分子メカニズムを検討したところ、HGF シグナルの下流では、Arf6 活性化因子の一つであるGrp1がArf6の活性化に寄与しており、活性化されたArf6は、接着因子であるβ1 integrinの細胞膜への輸送を制御することによって血管内皮細胞の遊走に関与していることが明らかとなりました。そこで、Grp1によるArf6の活性化を阻害する化合物SecinH3をマウスに投与したところ、腫瘍血管新生とそれに伴う腫瘍の成長が有意に抑制されました。

以上の結果は、血管内皮細胞に発現する Arf6 は、HGF シグナルの下流で Grp1 によって活性化され、β1 integrin の細胞膜への輸送を制御することによって個体における腫瘍血管新生に重要な役割を果たし、腫瘍の成長を制御していることを示しています。

## 今後の展開

本研究で得られた知見は、Arf6 シグナル伝達系を標的とした新たな腫瘍血管新生阻害剤の開発に繋がることと期待されます。また、Arf6は乳癌細胞にも発現しており、癌転移に重要な役割を果たしていることが報告されています(Hashimoto S. et al., 2004)。この報告と本研究で得られた研究結果から、Arf6 シグナル伝達系をターゲットにして、腫瘍血管新生と癌転移の両者を同時に阻害できる革新的な抗癌剤の開発に繋がる可能性があります。今後は、このような革新的な抗癌剤の創成を目指して、研究を展開して行く予定です。

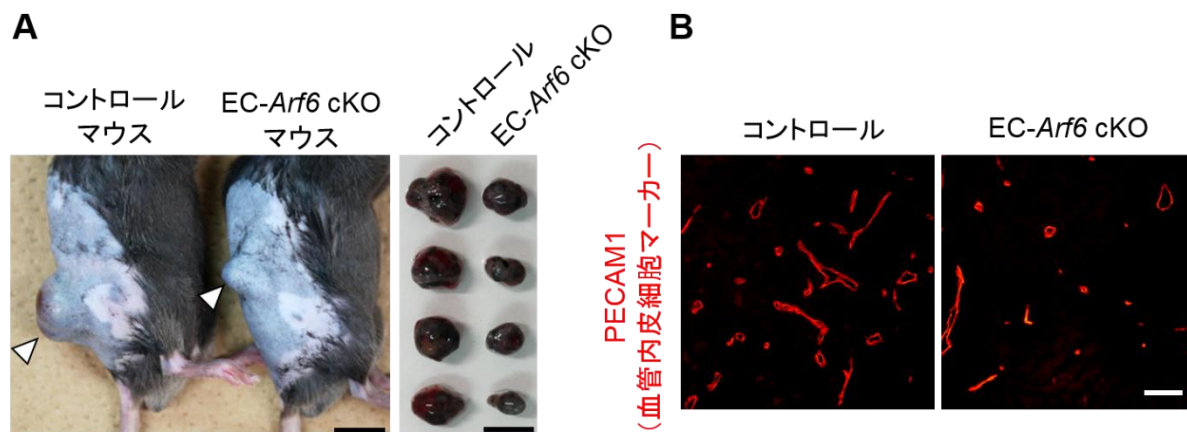


図 1. EC-Arf6 cKO マウスにおける腫瘍の成長と腫瘍血管新生の抑制

(A)腫瘍の成長。B16メラノーマ癌細胞をコントロールマウスおよびEC-Arf6 cKO マウスの背中皮下に移植し、腫瘍の成長を比較した。写真は、腫瘍細胞移植後 14 日目の腫瘍(右写真: 摘出前、左写真: 摘出後)を示す。EC-Arf6 cKO マウスでは、コントロールマウスと比較して腫瘍の成長が抑制されている。白矢尻: 移植部位に形成された腫瘍。スケールバー: 1 mm。

(B)腫瘍の抗 PECAM1 抗体による免疫染色像。癌細胞移植後 14 日目に腫瘍を摘出し、血管内皮細胞を特異的に染色する抗 PECAM1 抗体を用いて、腫瘍組織に侵入している血管内皮細胞を染色した。EC-Arf6 cKO マウスから摘出した腫瘍では、腫瘍血管新生が抑制されている。スケールバー: 100  $\mu$ m。

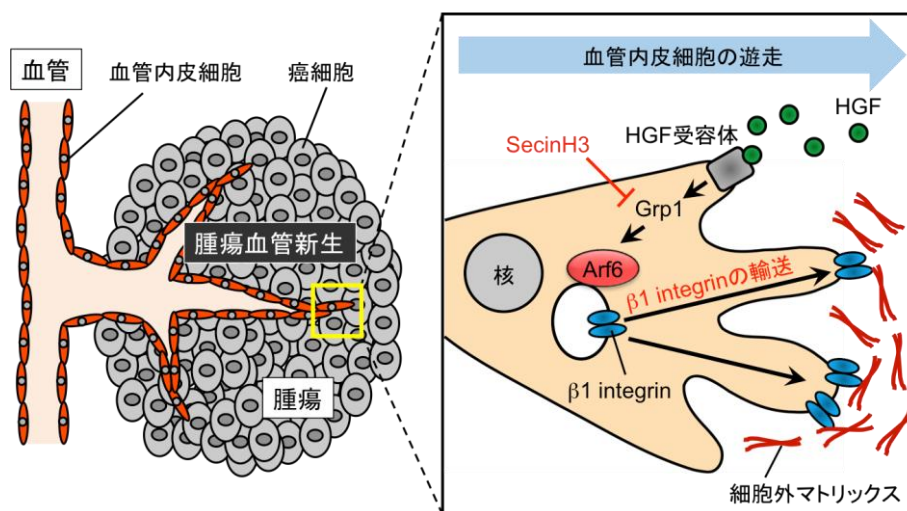


図 2. 腫瘍血管新生における Arf6 の機能モデル

癌細胞は種々の血管誘導因子を分泌して周囲の既存血管を刺激することにより腫瘍血管新生を誘導する。血管内皮細胞において、Arf6 は HGF シグナルの下流で Grp1 により活性化され、 $\beta 1$  integrin の細胞膜への輸送を制御している。細胞膜に輸送された  $\beta 1$  integrin は細胞外マトリックスとの接着を介して血管内皮細胞の遊走を駆動する。このような Arf6 の機能は、Grp1 を阻害する化合物 SecinH3 によって阻害することができるため、腫瘍の成長は SecinH3 の投与によって抑制することができる。

## 用語解説

### 注1) 低分子量 G 蛋白質

低分子量 G 蛋白質とは、細胞内に存在する分子量 20~30 kDa のグアニンヌクレオチド結合蛋白質です。現在ヒトでは 100 種類以上の低分子量 G 蛋白質が同定されており、Ras、Rho、Rab、Ran、Arf の 5 つのファミリーに分類されています。これらの蛋白質は、GTP を結合した活性型と GDP を結合した不活性型の 2 つの状態をサイクルすることにより、細胞内シグナル伝達の ON-OFF を切り替えるスイッチ機能を担っています。

### 注2) 細胞内小胞輸送

細胞内にはエンドソームや小胞体、ゴルジ体などの種々のオルガネラが存在します。細胞内小胞輸送とは、これらのオルガネラ間あるいは細胞膜-オルガネラ間を小胞が移動し、蛋白質や脂質が細胞内の異なる部位に輸送される機構です。

### 注3) 接着分子

細胞は、細胞外マトリックスや隣接する細胞と接着することによって様々なシグナルを授受することで、細胞の生存や細胞遊走などが制御されています。接着分子は、細胞が細胞外マトリックスや隣接する細胞と接着する際に直接の接着構造を形成する膜蛋白質の総称です。

### 注4) アクチン細胞骨格の再構成

アクチン細胞骨格は、単量体アクチン蛋白質が重合することによって形成される繊維状の構造体です。アクチン細胞骨格の再構成とは、アクチン細胞骨格の構造を変化させることを意味し、それにより細胞膜のダイナミックな構造変化が誘導されます。

### 注5) Cre/loxP システムの利用したコンディショナルノックアウト法

細胞、臓器、組織特異的または時期特異的に目的遺伝子を欠損させる方法をコンディショナルノックアウト法と呼びます。DNA 組換え酵素 Cre は、loxP 配列と呼ばれる特殊な DNA 配列を認識して、2 つの loxP 配列に挟まれた領域を DNA から切り取る活性を持つため、これを利用して細胞特異的または時期特異的に目的遺伝子を欠損させることができます。

## 参考文献

- Grepin R. and Pages G. Molecular mechanisms of resistance to tumour anti-angiogenic strategies. *J. Oncol.* 2010, 835680 (2010).
- Suzuki T. et al. Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol. Cell. Biol.* 30, 6149-6156 (2006).
- Hashimoto S. et al. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proc. Natl. Acad. USA* 101, 6647-6652 (2004)

## 掲載論文

- 【題名】Arf6 regulates tumor angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial  $\beta 1$  integrin recycling  
(Arf6はHGF依存的な $\beta 1$  integrinのリサイクリングを介して腫瘍血管形成および腫瘍の成長を制御する)

【著者名】 Tsunaki Hongu, Yuji Funakoshi, Shigetomo Fukuhara, Teruhiko Suzuki, Susumu Sakimoto, Nobuyuki Takakura, Masatsugu Ema, Satoru Takahashi, Susumu Itoh, Mitsuyasu Kato, Hiroshi Hasegawa, Naoki Mochizuki, Yasunori Kanaho

【掲載誌】 *Nature Communications* doi:10.1038/ncomms8925

問合わせ先

金保 安則(かなほ やすのり)

筑波大学 医学医療系 教授

望月 直樹(もちづき なおき)

国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部長